

Oscilatorna dinamika GTPaze Rac1 u amebi *Dictyostelium discoideum*

Blaž Ivšić, F-4291; Mentor: prof. dr. Igor Weber
Fizički odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Bijenička 32, Zagreb
(Dated: 20. siječnja 2019.)

Porodica GTPaza Rho predstavlja glavnu grupu proteina uključenih u regulaciju aktinskog citoskeleta u amebama *Dictyostelium discoideum*. Budući da se te amebe mogu repolarizirati najbrže od svih eukariotskih stanica, one predstavljaju zanimljiv biološki sustav za promatranje i proučavanje dinamike proteina tijekom staničnog kretanja. U ovom je seminaru predstavljen reakcijsko-difuzijski model dinamike proteina Rac1 i DGAP1 zasnovan na njihovoj interakciji koji pripada klasi modela primjerenih sustavima s očuvanom masom. Ponuđeni model može objasniti neke eksperimentalno primijećene obrasce u koncentracijama fluorescentno obilježenih proteina, kao i ovisnost njihove dinamike o parametrima sustava.

UVOD

Većini fizičara pojam oscilacija nije nimalo stran i pojavljuje se u svim granama fizike, pa tako i u biofizici. Stoga ne čudi što su se oscilacije opazile u mnogo bioloških sustava. Od makroskopskih oscilacija u ljudima i životinjama koje reguliraju disanje, otkucaje srca itd., do oscilacija unutar pojedinačnih stanica koje omogućavaju njihovo kretanje, diobu te mnoštvo drugih procesa. Cilj ovog seminaru je proučiti jednu vrstu oscilacija u amebi *Dictyostelium discoideum* koja joj omogućava efikasno pretraživanje površine u potrazi za hranom.

Biofizikalna osnova staničnog kretanja leži u aktinskom citoskeletu. Radi se o sustavu umreženih filamenata, koji nastaju polimerizacijom proteina aktina [1]. Pojedini filamenti, a i čitav sustav, mogu se vrlo brzo sastavljati i razgrađivati brzinom reda veličine od $1\mu\text{m/s}$. Aktinske niti međusobno su povezane specifičnim proteinima, dok je čitav sustav reguliran kompleksnom biokemijskom mrežom proteina koji se međusobno aktiviraju i deaktiviraju.

Stanice organizma *Dictyostelium discoideum* predstavljaju odličan biološki sustav za proučavanje staničnog kretanja. Te su amebe vrlo pokretljive, a njihov aktinski citoskelet s regulatornim proteinima, srodan je citoskeletu stanica sisavaca. Osim toga, njihov je životni ciklus kratak i haploidni genom sekvenciran, što omogućava efikasnu manipulaciju genima i time produkciju stanica s preizraženim odnosno potisnutim specifičnim proteinima. Također, metodama genetičkog inženjerstva moguće je obilježiti određene proteine fuzijom s fluorescentnim proteinima, te je takve kimerne proteine moguće pratiti u živim stanicama pomoću mikroskopije [5]. Kretanje amebe *Dictyostelium* ugrubo možemo razdvojiti na kemotaksiju (usmjereno kretanje stanica u gradijentu koncentracije određene tvari), te neusmjereno kretanje vegetativnih stanica u potrazi za hranom. Postoje i drugi procesi koji se temelje na istim biofizičkim osnovama i sličnim signalnim putovima, npr. citokineza, endocitoza, transport vezikula unutar stanice i slični, no oni premašuju opseg ovog seminaru. Biokemijska pozadina spomenutih procesa relativno je dobro poznata.

Za razumijevanje vremenskih i prostornih periodičnih

pojava u biologiji općenito, pa tako i u sklopu staničnog kretanja, potrebno je osmisliti fizikalne modele koji bi mogli razjasniti dinamiku promatranog sustava. Prvi je pojavu samoorganizirajućih obrazaca u biološkim sustavima promatrao Turing. On je pokazao kako je u sistemu s više komponenti, koje međudjeluju i difundiraju različitim brzinama, interakcija između kemijskih reakcija i difuzije dovoljna da uzrokuje nestabilnosti, čak i u sustavima sa stabilnom kemijskom ravnotežom. ([17] prema [8]).

Razlikujemo dvije osnovne primjene ovog principa u modeliranju unutarstaničnih dinamičkih procesa: to su tzv. modeli "aktivator-inhibitor" te "aktivator-deplecija". U prvom modelu jedna od tvari igra ulogu aktivatora koji djeluje autokatalitički i sporo difundira što dovodi do lokalnog rasta njegove koncentracije. Aktivator pritom potiče i stvaranje inhibitora koji brzo difundira i sprječava povećanje koncentracije aktivatora. Ovaj model pretpostavlja da je aktivator vezan za staničnu membranu (spora difuzija) dok se inhibitor nalazi većinom u citoplazmi (brza difuzija). Drugi pristup (aktivator-deplecija), umjesto inhibitora, kao drugu komponentu pretpostavlja supstrat koji se autokatalitički pretvara u aktivator. Ovaj model postulira produkciju supstrata u citoplazmi i degradaciju aktivatora na membrani [8].

Ponuđeno je nekoliko modela koji opisuju stanično kretanje i bazirani su na spomenutim pristupima. Miao i suradnici [13] ponudili su razrađenu verziju modela aktivator-inhibitor koji može objasniti različite modove vegetativnog kretanja kao i kemotaksiju. Njihov pristup bazira se na pobudljivoj signalnoj mreži (signal transduction excitable network), pri čemu prelazak praga ekscitabilnosti mreže uzrokuje pojavu uzoraka. Sličan pristup izabrali su i Shi i suradnici [16], koji su uz interakcije između proteina u model uključili i deformacije membrane. S druge strane, kombinacijom dva aktivator-inhibitor modela, također je moguće reproducirati određene karakteristike staničnog kretanja [9]. Problem s gornjim pristupima je što ne uzimaju u obzir da su sinteza i degradacija proteina uključenih u signalne putove mnogo sporije od njihovih interakcija. Stoga bismo modele unutarstaničnih procesa trebali promatrati kao sisteme s očuvanom masom. Drugim riječima pojava

obrazaca ovisi o preraspodjeli tvari unutar stanice, a ne o njihovom nastajanju i raspadanju [8].

Važnu ulogu u regulaciji aktinskog citoskeleta imaju male GTPaze Rho. To su signalni proteini koji na sebe mogu vezati GTP (gvanozin-trifosfat) i hidrolizirati ga u GDP (gvanozin-difosfat). Ako je na GTPazu vezan GTP govorimo o aktivnom obliku, dok u slučaju kada je vezan GDP govorimo o inaktivnom obliku GTPaze [12]. U aktivnom obliku ti se proteini mogu vezati za ciljne molekule (efektore) i time prenositi signal. Efektori imaju tzv. GBD domene (GTPase Binding Domains) na koje se specifično vežu određene aktivne GTPaze. Vezanjem GTPaza efectori mijenjaju svoju konformaciju čime se aktivira njihova funkcija kao npr. polimerizacija aktina u slučaju proteina iz grupe formina. Aktivnost malih GTPaza reguliraju sljedeći proteini: GEF proteini (Guanine-Nucleotide Exchange Factors) koji kataliziraju izmjenu molekula GDP za GTP, GAP proteini (GTPase-Activating Proteins) koji stimuliraju hidrolizu GTPa vezanog na GTPazu i time prekidaju prijenos signala, te GDI proteini (Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitors) koji onemogućuju disocijaciju GTPaze i vezanog nukleotida GDP [5].

Jedan od ključnih proteina iz familije GTPaza Rho koji kontrolira kretanje ameba *Dictyostelium* je Rac1. Pokazano je kako aktivni oblik Rac1 sudjeluje u regulaciji aktinskog citoskeleta na prednjem kraju stanice vezanjem i aktivacijom proteina Scar/WAVE koji dalje regulira proteinski kompleks Arp2/3, kao i na stražnjem kraju stanice vezanjem u kompleks s proteinima DGAP1 te korteksilinom. Arp2/3 inducira polimerizaciju aktina i stvaranje protruzija na prednjem kraju stanice, dok kompleks koji se sastoji od proteina DGAP1, Rac1 i korteksilina sprječava nastanak protruzija na stražnjem kraju. Primijećeno je kako su područja djelovanja ova dva kompleksa međusobno približno isključiva [6]. U ovom je seminaru ponuđen fizikalni model koji može objasniti pojavu jednog ili više područja djelovanja spomenutih kompleksa te je uspoređen s eksperimentalnim rezultatima.

REZULTATI

Za teorijsku je analizu najprije napravljen detaljni mehanistički model stanične polarizacije uvjetovane Rac1 proteinom. Stanica je promatrana kao jednodimenzionalni sustav s dva odvojena područja: citoplazma i membrana. Iako detaljni oblik stanice može igrati ulogu u nastajanju obrazaca, budući da su koeficijenti difuzije mnogo veći u citoplazmi nego na membrani, svaki takav tranzijentni obrazac, koji ovisi o geometriji, s vremenom biva potisnut [14]. Dodatna pretpostavka koja pojednostavljuje model, je da ne postoje procesi u citoplazmi koji bi izmijenili stanja proteina, kao što je na primjer izmjena nukleotida na GTPazi.

Kao što je već spomenuto u ranijim su radovima primijećene dvije različite populacije aktivnog Rac1 proteina na membrani [7]. Prva, pokretna i dinamična frakcija

uključena je u regulaciju Arp2/3 kompleksa na membrani koji posreduje u polimerizaciji aktina i stvaranju protruzija. Druga frakcija aktivnog Rac1 proteina sakuplja se na komplementarnim područjima, odnosno na stražnjem kraju stanica koje se kreću i veže se u kompleks s efektorom DGAP1. Naš reakcijsko-difuzijski model sastoji se od dva glavna dijela prikazana na slici 1. Kako bi se smanjio broj slobodnih parametara modela, kao varijable su eksplicitno uključene samo koncentracije i prostorne distribucije Rac1, GAP te DGAP1. Prvi dio modela opisuje kruženje između aktivnog oblika Rac1 GTPaze na membrani i njezinog inaktivnog oblika u citoplazmi posredovano vezanjem proteina GAP. Vezanje Rac1 na membranu i njegova posljedična aktivacija GEF proteinom svedena je na jedan korak. Uz intrinzičnu stopu vezanja za membranu, u model je uključen i član koji se odnosi na pozitivnu povratnu spregu, koja lokalno pojačava aktivaciju i vezanje Rac1 proteina. Pokazano je kako u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* GTPaza Cdc42, njezin GEF i efektor Bem1 zajedno djeluju kako bi lokalno pojačali aktivaciju i akumulaciju Cdc42 proteina [2]. Proces inaktivacije Rac1 GTPaze putem GAPa i njezino vraćanje u citoplazmu, posredovano GDI proteinima, također su spojeni u jedan korak. Drugi dio modela opisuje interakcije Rac1 molekula s efektorom DGAP1. U modelu postoje dva načina razgradnje Rac1-DGAP1 kompleksa. U prvom se slučaju, nakon raspadanja, aktivni Rac1 ponovno veže za membranu, dok se DGAP1 vraća u citoplazmu. U drugom slučaju oba proteina vraćaju se u citoplazmu. U model smo također uključili kooperativno vezanje DGAP1 proteina na mjesta na membrani gdje je koncentracija aktivnog Rac1 već povećana. Ovak član pomaže u kontroliranju faznog odnosa između valova Rac1 i DGAP1 proteina na membrani. Model prikazan na slici 1 sastoji se od sljedećih 7 jednadžbi:

$$\frac{\partial}{\partial t} R_D = d_R \Delta R_D + k_3 G_c - R_D M_R (k_1 + k_{11} R_T) + k_{51} D_c, \quad (1)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} G = d_G \Delta G + k_3 G_c - k_2 R_T G, \quad (2)$$

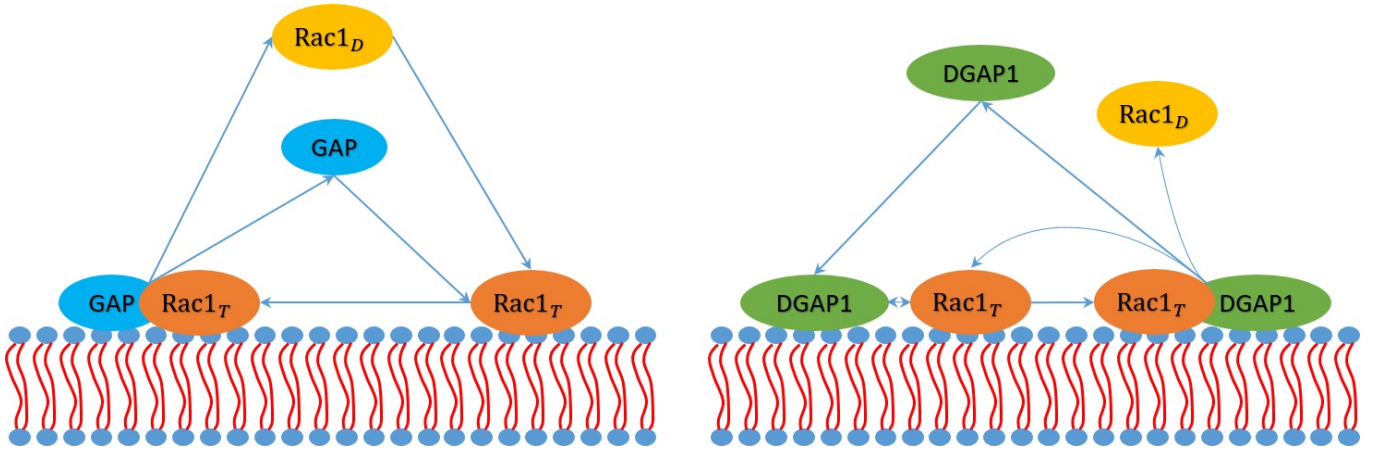
$$\frac{\partial}{\partial t} D = d_D \Delta D - M_D D (k_6 + k_{12} R_T) + (k_5 + k_{51}) D_c, \quad (3)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} R_T = k_5 D_c - k_2 R_T G - k_4 R_T D_m + R_D M_R (k_1 + k_{11} R_T), \quad (4)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} D_m = M_D D (k_6 + k_{12} R_T) - k_4 R_T D_m, \quad (5)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} G_c = k_2 R_T G - k_3 G_c, \quad (6)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} D_c = k_4 R_T D_m - (k_5 + k_{51}) D_c, \quad (7)$$



Slika 1. Shematski prikaz interakcija molekula *Rac1*, *GAP* i *DGAP1*. Oznaka *Rac1_D* predstavlja neaktivni, citoplazmatski *Rac1_{GDP}*, dok *Rac1_T* označava aktivni *Rac1_{GTP}* na membrani.

s nametnutim periodičkim rubnim uvjetima. R_D , G i D označavaju koncentracije *Rac1*-GDP, *GAP* i *DGAP1*, dok se R_T , D_m , G_c te D_c odnose na koncentracije *Rac1*-GTP, *DGAP1*, *Rac1*-*GAP* kompleksa i *Rac1*-*DGAP1* kompleksa na membrani. Za sve je proteine pretpostavljeno da difundiraju samo u citoplazmi. Kao što je vidljivo iz jednadžbi, ukupni broj čestica je očuvan u vremenu:

$$\frac{\partial}{\partial t} \int (R_D + R_T + G_c + D_c) dx = 0 \quad (8)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \int (G_c + G) dx = 0 \quad (9)$$

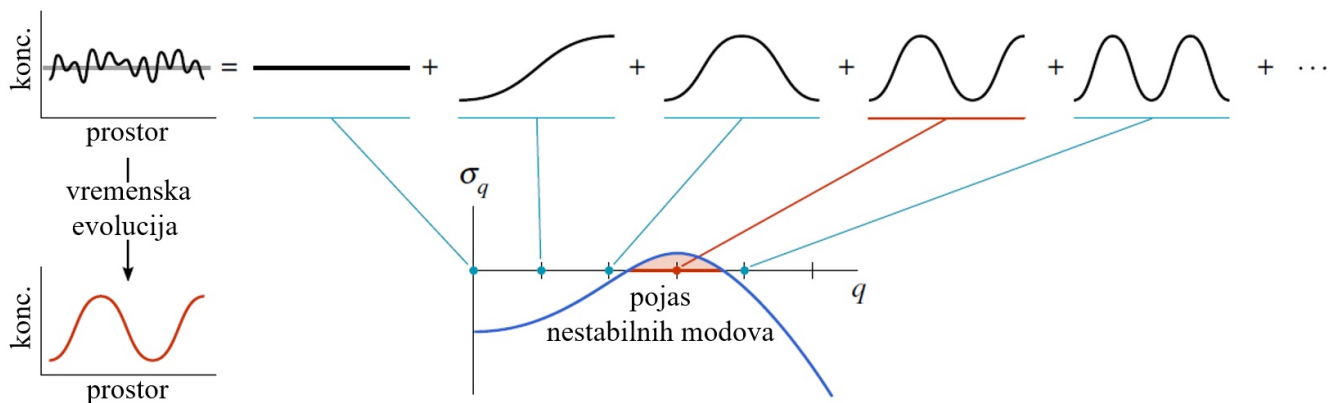
$$\frac{\partial}{\partial t} \int (D_c + D_m + D) dx = 0 \quad (10)$$

U jednadžbama, $M_R = (R_T^{max} - R_T)$ i $M_D = (D_m^{max} - D_m)$ označavaju koncentracije slobodnih vezivnih mjesta za *Rac1* i *DGAP1* na membrani. Za rješavanje jednadžbi primijenjene su analitičke i numeričke metode kako bi se kvantitativno odredila prostorno-vremenska raspodjela proteina.

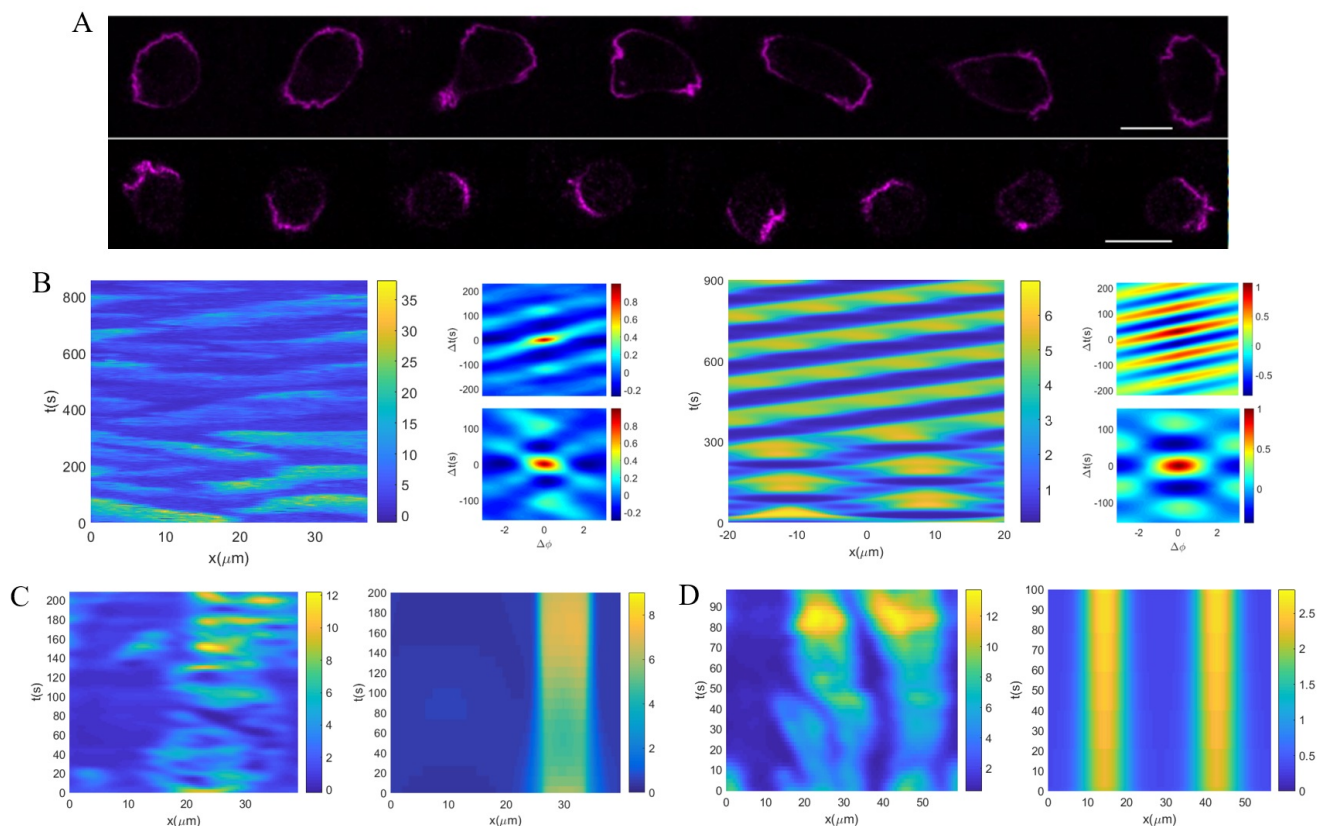
Početak pojavljivanja obrazaca može se proučiti linearnom analizom stabilnosti. U tom pristupu, na homogenu raspodjelu proteina nametnuta je mala nasumična perturbacija. Svaku takvu perturbaciju moguće je razviti, pomoću Fourierove analize, u modove proporcionalne sa $\cos(qx)$ (Slika 2). Sve dok su amplitude male, svaki mod raste ili trne eksponencijalno kao $\exp(\sigma_q t) \cos(qx)$, ovisno o predznaku stope rasta σ_q (odnosno preciznije njezinog realnog dijela $Re[\sigma_q]$). Linearnom analizom stabilnosti moguće je izračunati stope rasta modova s bilo kojim valnim brojem q te tako dobiti disperzijsku relaciju koja definira pojas nestabilnih modova. Spomenuti nestabilni modovi mogu otprilike predvidjeti unutarstanične strukture s karakterističnim valnim duljinama $\frac{2\pi}{q}$. Napomenimo kako precizno određivanje ka-

rakterističnih prostornih skala obrazaca općenito zahtjeva numeričko rješavanje. Linearna analiza stabilnosti predviđa jedino karakteristične skale obrazaca koji potječu iz homogenog stanja i ne bi se trebale miješati s karakterističnim skalama daleko od uniformnog stanja (konačnog obrasca). Na sreću, numeričkim rješavanjem originalnog sustava nelinearnih jednadžbi modela, pokazalo se da nestabilni modovi, određeni analizom stabilnosti, preživljavaju i daleko od ravnoteže, s amplitudama usporedivim s pravim staničnim obrascima. Tako je ipak moguće ovakvom analizom našeg modela predvidjeti koji se modovi stojnih valova mogu očekivati. Rezultati numeričkih simulacija modela uspoređene su s eksperimentalnim rezultatima. Od 42 snimljene stanice izabrane su one koje pokazuju oscilatorno ponašanje. Pronađeno je 9 oscilirajućih obrazaca s dominantnim prvim modom te 7 obrazaca s dominantnim drugim modom. Duljine membrana izabranih stanica nalaze se unutar intervala $29 - 49 \mu m$. Koristeći taj interval, u analizi stabilnosti, dok su drugi parametri bili fiksni određeno je da su uistinu samo prvi i drugi mod u Fourierovom razvoju nestabilni. Analiza stabilnosti, osim u već spomenutom kontekstu, korisna je i za pretraživanje parametarskog prostora u svrhu nalaženja nestabilnosti koje dovode do pojave obrazaca, budući da je nekoliko puta brža od provođenja općenitih numeričkih simulacija.

Budući da je dinamička polarizacija stanica koju posreduje *Rac1* GTPaza vrlo kompleksna, odlučili smo pronaći karakteristična svojstva procesa koje je moguće eksperimentalno potvrditi. Simulacije modela predviđaju nekoliko glavnih oblika ponašanja stanica: putujuće valove, stojne valove (prvi i drugi mod Fourierovog razvoja), te njihove kombinacije. Uz to su za određene vrijednosti parametara dobivena stanja stabilne polarizacije (nehomogena stacionarna stanja). Stojni valovi su obično tranzijentni prilikom formacije stabilnijih putujućih valova odnosno polarnih distribucija, iako mogu trajati i desetak minuta, ovisno o početnim uvjetima. Ovi se obrasci poklapaju s tipovima oblika stanica koje su proučavali



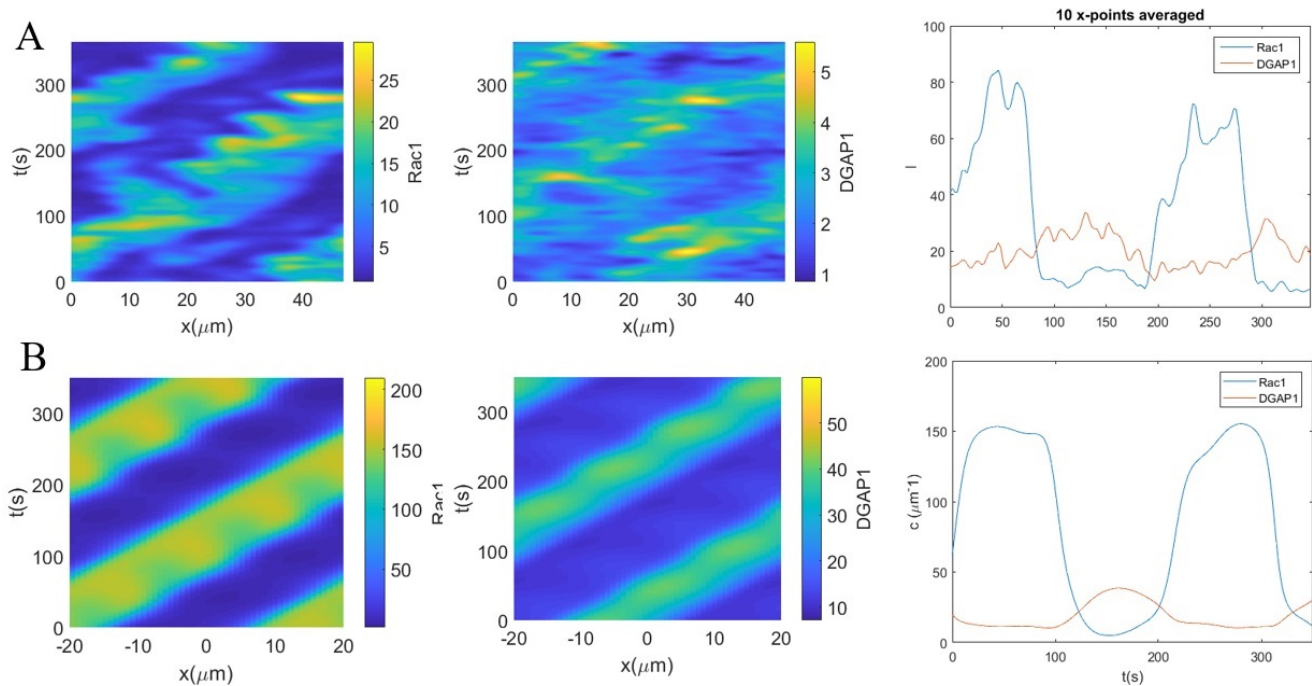
Slika 2. Svaka nasumična perturbacija (Crna linija) prostorno uniformnog stanja (siva linija) može se razviti po Fourierovim modovima. Linearna analiza stabilnosti daje stope rasta amplituda σ_q svih modova q , što je prikazano disperzijskom relacijom (plava linija). Nestabilnim modovima (označenim crveno) amplituda raste i određuje obrazac koji nastaje iz nasumične perturbacije. Preuzeto iz:[8].



Slika 3. (A) Pojava stacionarnih (gore) i putujućih valova (dolje) fluorescentne sonde za aktivni *Rac1* u stanicama *Dictyostelium* divljeg tipa tijekom nasumičnog kretanja. Mjerilo iznosi $10\mu m$. (B) Oscilacije kao prijelazni oblik rješenja. Lijevo: eksperiment. Desno: teorija. Male slike: Autokorelacijska funkcija signala (rješenja) – pomažu razlučiti stacionarne od putujućih valova. (C) Monopolarne stanice. Lijevo: eksperiment. Desno: teorija. (D) Bipolarne stanice. Lijevo Eksperiment. Desno Teorija

Maeda i suradnici. Oni su otkrili kako stanice *Dictyostelium* u vegetativnom i agregirajućem stanju, bez vanjskih podražaja, obično poprimaju tri različita obrasca: rotacije, oscilacije i elongacije [11]. Kako je aktivni Rac1 odgovoran za promjene stanja aktinskog citoskeleta koji

određuje oblik, možemo očekivati pojavu sličnih obrazaca u njegovoj koncentraciji. Napomenimo kako elongacija podrazumijeva stanja s jednim ili dva područja povišene koncentracije Rac1 proteina na membrani, što nazivamo monopolarnim odnosno bipolarnim stanjima.



Slika 4. (A) Eksperimentalno izmjereni membranski intenziteti fluorescentnih proba za aktivni *Rac1* (lijevo) i *DGAP1* (sredina) prikazani u obliku kimografa. Desno: vremenska evolucija intenziteta fluorescencije na fiksnom položaju na membrani. (B) Prikaz koncentracije aktivnog proteina *Rac1* te ukupne koncentracije proteina *DGAP1* (u samostalnom obliku i u kompleksu), dobivenih numeričkim rješavanjem jednadžbi modela.

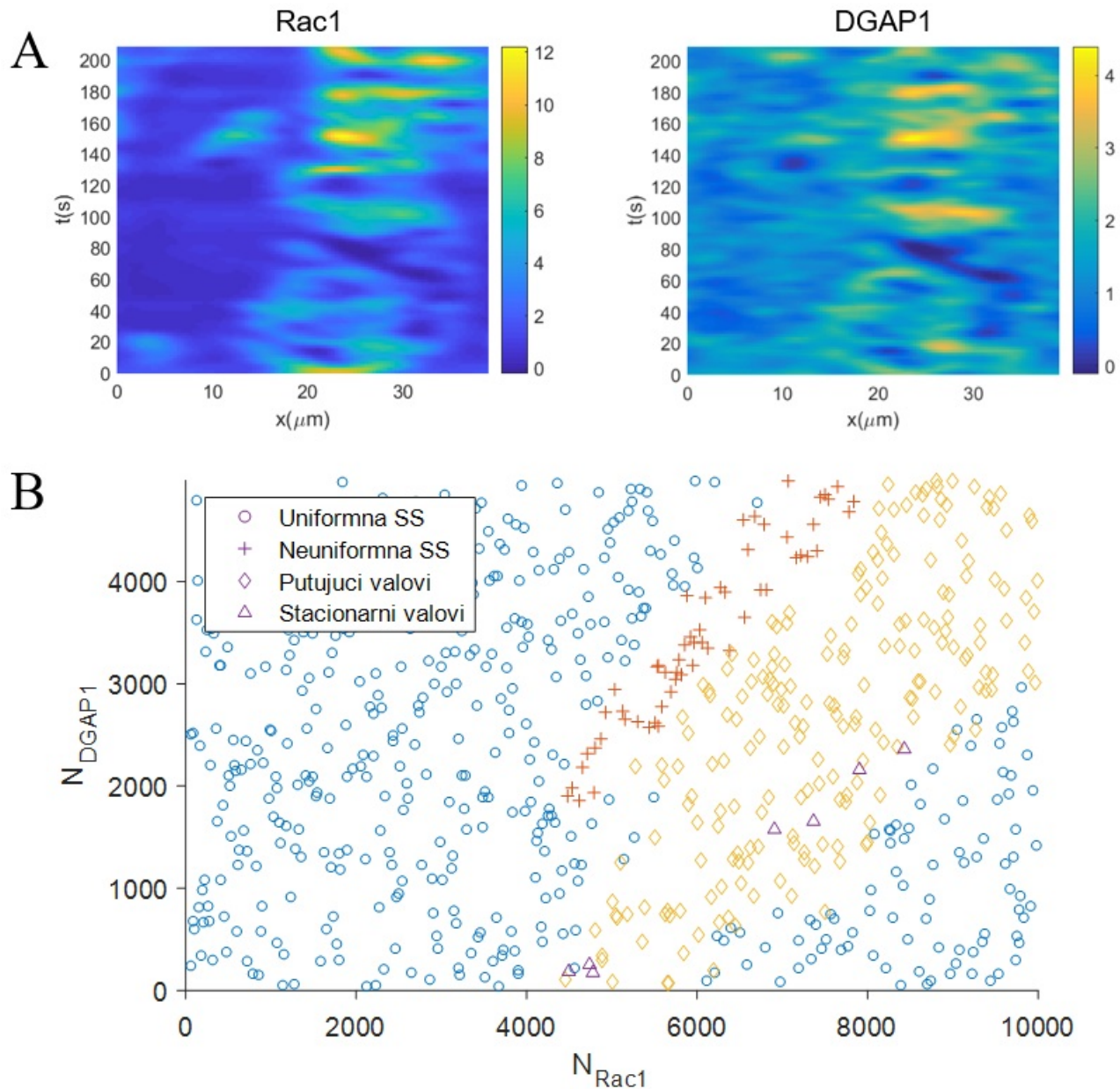
Proučavanjem snimke kretanja stanica nađeni su i takvi obrasci. Na slici 3 prikazana je usporedba eksperimentalnih rezultata i simulacija modela.

Proučavanjem vremenske evolucije koncentracije proteina *Rac1* i *DGAP1* utvrđena je karakteristična razlika u fazi između *Rac1* te sume koncentracija *Rac1*-*DGAP1* kompleksa i *DGAP1*. Ovdje u obzir moramo uzeti sumu spomenutih proteina budući da *DGAP1* proba u eksperimentima ne može razlučiti između *DGAP1* i kompleksa *Rac1*-*DGAP1*. Ako prostorno-vremenska distribucija odgovara putujućim odnosno stojnim valovima, variranjem parametara modela određeno je da *Rac1* val preštuje *DGAP1* val za otprilike $1.5 - 3rad$. Ovaj se rezultat slaže s već prije spomenutim radovima u kojima je otkriveno kako se aktivni oblik *Rac1* proteina lokalizira na vodećem kraju, dok je *DGAP1* ograničen na stražnji kraj stanice. U sljedećem je koraku snimljeno 10 stanica divljeg tipa s fluorescentno obilježenim aktivnim oblicima *Rac1* i *DGAP1*, a čija je distribucija odgovarala stojnim odnosno putujućim valovima. Rezultati ukazuju kako se ove dvije distribucije zapravo djelomično preklapaju s faznom razlikom $\phi = 2.4 \pm 0.4rad$ i nisu lokalizirane na međusobno isključivim dijelovima membrane, što je u skladu s predviđanjima našeg modela. Primjer odnosa putujućih valova *Rac1* i *DGAP1* proteina prikazan je na slici 4. U sljedećem smo koraku proučili razliku u fazi između povišenih koncentracija spomenutih proteina koristeći parametre modela koji daju monopolarne odnosno bipolarne stanja. Očekivali smo slične re-

zultate kao u slučaju putujućih i stojnih valova, budući da je općenito prihvaćeno kako se te dvije populacije lokaliziraju na suprotnim krajevima stanice. Ispostavilo se, međutim, kako su maksimumi njihovih koncentracija u fazi odnosno da se preklapaju. Proučavanjem snimljenih stanica ispostavilo se da se distribucije *Rac1* i *DGAP1* zaista preklapaju ukoliko je stanica u monopolarnom odnosno bipolarnom stanju (slika 5A). Primjećeno je kako model reproducira polarizirana stanja ako je broj *DGAP1* molekula iznad određenog praga. S druge strane formacija stojnih i putujućih valova u koncentraciji *Rac1* GTPaze ne zahtjeva prisutnost *DGAP1* efektor (slika 5B).

DISKUSIJA

Naši rezultati upućuju na to da deterministička reakcijsko-difuzijska dinamika uvjetuje raspodjelu *Rac1* GTPaze u stanicama amebe *Dictyostelium discoideum*. Model predstavljen u ovom seminaru primjer je reakcijsko-difuzijskog sustava s očuvanom masom koji može stvoriti obrasce u koncentracijama. U prijašnjim je radovima već ponuđeno nekoliko sličnih modela. Na primjer Klünder i suradnici osmislili su model polarizacije stanice kvasca, koji se temelji na sličnim pretpostavkama kao i naš [10]. Bitna razlika ova dva modela je ta što u njihovom modelu glavnu ulogu u procesu polarizacije igra *Cdc42*. Taj protein porodice *Rho* je prisutan i u



Slika 5. (A) Kolokalizacija proba za *Rac1* i *DGAP1* tijekom usmjerenog gibanja. (B) Kvalitativna ovisnost rješenja matematičkog modela o bifurkacijskim parametrima N_{Rac1} i N_{DGAP1} . Polarna stanja, odnosno neuniformna stacionarna stanja pojavljuju se kao rješenja modela tek prelaskom praga ukupnog broja *DGAP1* molekula.

drugim eukariotskim stanicama, no nema ga u amebi *Dictyostelium* gdje njegovu ulogu igra *Rac1*. Naš model kao ključni dio sadrži interakciju GTPaze s njezinim efektorom. Ponudeni su i modeli staničnog kretanja za amebe *Dictyostelium* s naglaskom na kemotaksiji [3], zasnovani na aktivator-inhibitor pristupu spomenutom u uvodu. Ti modeli uključuju i interakcije s fosfolipidima na membrani, dok je naš fokusiran na interakciju između proteina. Iako spomenuti modeli mogu reproducirati određene oblike kretanja vegetativnih stanica, njihova je glavna mana što varijable nisu vezane za

specifične proteine. Naš je pristup zasnovan na eksperimentalnim radovima koji su pokazali da je ključna komponenta signalnog puta koji promatramo protein *Rac1* i njegova interakcija s efektorom *DGAP1* [7].

Ponudeni model uspješno reproducira primijećenu lokalizaciju aktivnog *Rac1* na prednjem i *DGAP1* proteina na stražnjem kraju stanice, uz neke nove spoznaje. Najprije je pokazano kako simulacije i eksperimentalni rezultati upućuju da te dvije populacije nisu lokalizirane na međusobno isključivim područjima, već se mogu donekle preklapati, ovisno o parametrima i početnim uvjetima.

Taj je zaključak potkrijepljen snimljenim monopolarnim i bipolarnim stanjima stanica. Ponuđeni model predviđa kako su monopolarna i bipolarna stanja uvjetovana pracom količine DGAP1 proteina u stanici. To povlači da stanice s potisnutim DGAP1 efektorom ne mogu formirati takva stanja, što planiramo istražiti u budućnosti proučavanjem mutanata. Model opisan u ovom radu predstavlja prvi takve vrste za amebu *Dictyostelium discoideum* i može ponuditi nekoliko različitih obrazaca primijećenih u eksperimentima. Jedno od mogućih poboljšanja modela je uključivanje stohastičkih procesa koji bi mogli obogatiti dinamiku simulacija takvih sustava.

METODE

Kulture stanica, mikroskopija i obrada slika

Za određivanje dinamike i lokalizacije aktivnog Rac1 proteina, u eksperimentima su korištene stanice divljeg tipa AX2 soja koje su proizvodile fluorescentno obilježenu sondu koja se veže specifično za aktivnu formu GTPaze Rac1. Nadalje, za promatranje odnosa distribucija aktivnog Rac1 i DGAP1 na membrani korištene su stanice AX2 s izraženom fluorescentnom probom za aktivni oblik Rac1 kao i fluorescentno obilježenim proteinom DGAP1. Fluorescencijska konfokalna mikroskopija živih stanica *Dictyostelium discoideum* provedena je na mikroskopu Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems) na temperaturi 22°, u malim posudicama na staklenoj podlozi. Stanice su dva puta isprane u fosfatnom puferu 30 minuta prije snimanja. Valne duljine za pobuđivanje i detekciju bile su: 514nm i 525–565nm za DYFP te 574nm i 605–670nm za mRFPmars. Kvantitativna analiza fluorescentnih signala napravljena je u programu ImageJ [15] s modulom QuimP [4].

Numeričke simulacije

Sve numeričke simulacije napravljene su u MATLABu[18]. Prostorna domena podijeljena je

na 50 točaka. Za procjenu prostornih derivacija je korištena je metoda konačnih razlika, koja je efektivno svela problem na set 50 običnih diferencijalnih jednadžbi. Te su jednadžbe riješene pomoću MATLABa koristeći funkciju *ode15s*. Autor kodova je Marko Šoštar.

Analiza korelacije

Kako bismo mogli bolje razlučiti pojavu obrazaca fluorescentnih proba korištena je autokorelacijska funkcija, dok je za određivanje fazne razlike između signala izračunata 2D križna korelacija fluorescentnih intenziteta Rac1 i DGAP1. Autokorelacijska funkcija intenziteta Rac1 signala $I_{Rac1}(x, t)$ i križna korelacijska funkcija između $I_{Rac1}(x, t)$ te $I_{DGAP1}(x, t)$ definirane su na sljedeći način:

$$C_{I_{Rac1}, I_{Rac1}}(\Delta x, \Delta t) = \frac{\langle \overline{I_{Rac1}}(x + \Delta x, t + \Delta t) \cdot \overline{I_{Rac1}}(x, t) \rangle_{x,t}}{\langle \overline{I_{Rac1}}^2(x, t) \rangle_{x,t}}, \quad (11)$$

$$C_{I_{Rac1}, I_{DGAP1}}(\Delta x, \Delta t) = \frac{\langle \overline{I_{Rac1}}(x + \Delta x, t + \Delta t) \cdot \overline{I_{DGAP1}}(x, t) \rangle_{x,t}}{\sqrt{\langle \overline{I_{Rac1}}^2(x, t) \rangle_{x,t} \cdot \langle \overline{I_{DGAP1}}^2(x, t) \rangle_{x,t}}}. \quad (12)$$

ZAHVALE

Htio bih zahvaliti prof. dr. Igoru Weberu na njegovom mentorstvu i pomoći, kao i njegovom doktorandu Marku Šoštaru koji me uveo u ovo područje i uvelike mi pomogao s izradom seminara.

-
- [1] A. Bretscher. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology*, 7(1):337–374, 1991.
- [2] A. Butty, N. Perrinjaquet, A. Petit, M. Jaquenoud, J. E. Segall, K. Hofmann, C. Zwahlen, and M. Peter. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor *cdc24* at sites of polarization. *The EMBO Journal*, 21(7):1565–1576, 2002.
- [3] P. N. Devreotes, S. Bhattacharya, M. Edwards, P. A. Iglesias, T. Lampert, and Y. Miao. Excitable signal transduction networks in directed cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1):103–125, 2017.
- [4] D. Dormann, T. Libotte, C. J. Weijer, and T. Bretschneider. Simultaneous quantification of cell motility and protein-membrane-association using active contours. *Cell Motility*, 52(4):221–230, 2002.
- [5] Rivero F. and H. Xiong. Chapter two - rho signaling in dictyostelium discoideum. In Kwang W. Jeon, editor, *International Review of Cell and Molecular Biology*, volume 322 of *International Review of Cell and Molecular Biology*, pages 61 – 181. Academic Press, 2016.
- [6] V. Filić, J. Marinović, M. and Faix, and I. Weber. A dual role for rac1 gtpases in the regulation of cell motility. *Journal of Cell Science*, 125(2):387–398, 2012.

- [7] V. Filić, M. Marinović, J. Faix, and I. Weber. The iqgap-related protein dgap1 mediates signaling to the actin cytoskeleton as an effector and a sequestrator of rac1 gtpases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15):2775–2785, 2014.
- [8] J. Halatek, F. Brauns, and E. Frey. Self-organization principles of intracellular pattern formation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1747):20170107, 2018.
- [9] C. Huang, C. Tang, M. and Shi, P. A. Iglesias, and P. N. Devreotes. An excitable signal integrator couples to an idling cytoskeletal oscillator to drive cell migration. *Nature Cell Biology*, 15(1):1307, 2013.
- [10] B. Klünder, T. Freisinger, R. Wedlich-Söldner, and E. Frey. Gdi-mediated cell polarization in yeast provides precise spatial and temporal control of cdc42 signaling. *PLOS Computational Biology*, 9(12):1–12, 12 2013.
- [11] Y. T. Maeda, J. Inose, M. Y. Matsuo, S. Iwaya, and M. Sano. Ordered patterns of cell shape and orientational correlation during spontaneous cell migration. *PLOS ONE*, 3(11):1–14, 11 2008.
- [12] M. Marinović. *Dinamika GTPaza Rac1 i njihova uloga u regulaciji polarnosti stanica Dictyostelium discoideum*. PhD thesis, Biološki odsjek Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6. 10000 Zagreb, 2015.
- [13] Y. Miao, S. Bhattacharya, M. Edwards, H. Cai, T. Inoue, P. A. Iglesias, and P. N. Devreotes. Altering the threshold of an excitable signal transduction network changes cell migratory modes. *Nature Cell Biology*, 19(1):329, 2017.
- [14] P. Rangamani, A. Lipshtat, E. U. Azeloglu, R. C. Calizo, M. Hu, S. Ghassemi, J. Hone, S. Scarlata, S. R. Neves, and R. Iyengar. Decoding information in cell shape. *Cell*, 154(6):1356 – 1369, 2013.
- [15] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, and Albert Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(1):676, 2012.
- [16] C. Shi, C. Huang, P. N. Devreotes, and P. A. Iglesias. Interaction of motility, directional sensing, and polarity modules recreates the behaviors of chemotaxing cells. *PLOS Computational Biology*, 9(7):1–17, 07 2013.
- [17] A. M. Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 52(1):153–197, Jan 1990.
- [18] The MathWorks Natick MA USA. Matlab, r2017b (9.3.0.713579), 2017.